マルチモードイオン源を使用した RRLC/トリプル四重極質量分析法による 血清中のカンナビノイドと アンフェタミンの分析

アプリケーション

トキシコロジー

著者

Jürgen Wendt
Agilent Technologies
Sales and Support GmbH
Waldbronn, Germany

Jörg Röhrich
Institute of Legal Medicine, University Mainz
Mainz, Germany

概要

LC/MS/MS は、生体マトリクス中のアンフェタミンとカンナビノイドを分析するのに役立つ分析手法です。アンフェタミンは、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) で良好にイオン化されますが、カンナビノイドは大気圧化学イオン化 (APCI) でより良好な感度を示します。LC 分離に 1.8 µm の粒子径の RRHT カラムを使用し、1回の分析で両方の化合物種に対してバランスのとれたレスポンスを実現するために、Agilent G1978B マルチモードイオン (MMI) 源を利用しました。今回示したメソッドでは、日内および日間変動について良好な再現性が示されました。変動係数は 3〜15% の範囲で、ほとんどは 5〜10% の範囲に収まりました。

はじめに

大麻は、ヨーロッパおよび米国で最も広く使用されている違法薬物です。さらに、ここ数年、アンフェタミン誘導体などの交感作用のある薬物の乱用が著しく増加しています。その結果、乱用薬物の影響下での運転が、交通安全に関する深刻な問題になりました。このため、大麻およびアンフェタミン (メチレンジオキシ誘導体であるメチレンジオキシメトアンフェタミン (MDMA) およびメチレンジオキシエチルアンフェタミン (MDE) を含む) の摂取後の運転は、1998 年にドイツ道路交通法によって罰則規定が設けられました。その後、Δ9-テトラヒドロカンナビノール (THC) またはアンフェタミン誘導体に関する血清の毒物分析の数が非常に増加しました。したがって、ラボでは比較的短時間に大量のサンプルを処理できる分析メソッドが必要です。LC/MS/MS はこれらのニーズに適した手法です。

アンフェタミンは、塩基性の極性化合物であり、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) で良好にイオン化されますが、比較的無極性のカンナビノイドは大気圧化学イオン化 (APCI) で良好な感度を示します (図1)。1 回の分析で各クラスの薬物に最適なイオン化手法を使用し、両方の化合物クラスに対してバランスのとれたレスポンスを実現するために、Agilent G1978B マルチモードイオン (MMI) 源 (図2) を評価しました。MMI ソースは、ESI モードあるいは APCI モードで、または ESI と APCI を同時に使用する "mixed (同時イオン化) "モードで操作できます。イオン化モードの選択とパラメータ設定は、分析中にタイムプログラムできます。

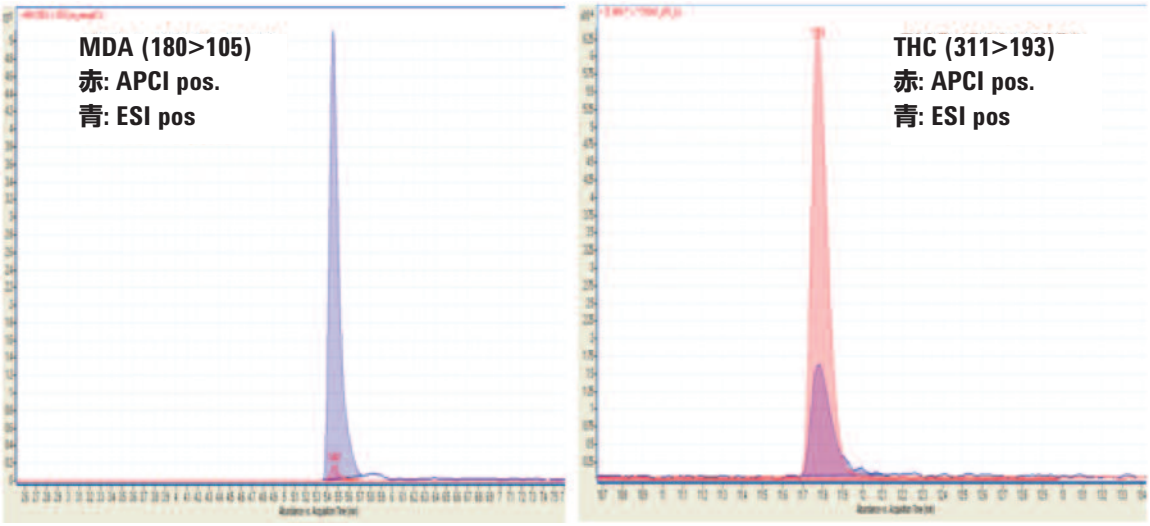

図1.　ESI モードと APCI モードでの MDA および THC レスポンスの比較

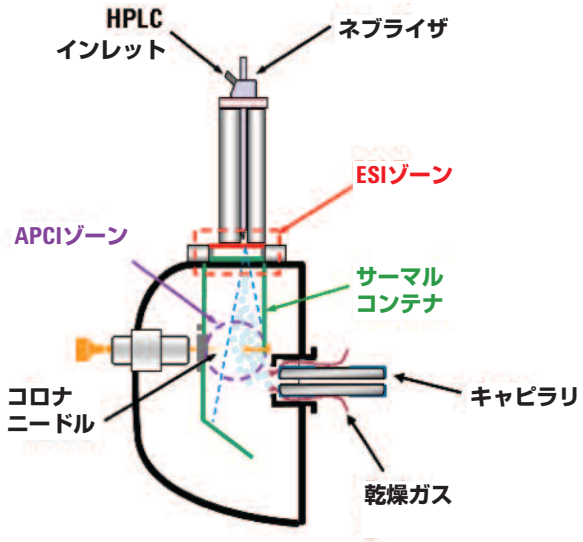

図2.　マルチモードイオン源の構造

実験手法

試薬

すべての溶媒および試薬は分析グレードのものを使用しました。メタノール、アセトン、酢酸、ジクロロメタン、2-プロパノール、およびアンモニアは E. Merck (ドイツ、ダルムシュタット) または Sigma-Aldrich (ドイツ、ダイゼンホッフェン) から購入しました。固相抽出カラムは、Mallinckrodt Baker (ドイツ、グリーシャム) から購入し、すべての薬物標準溶液と重水素化化合物は Cerilliant (テキサス州オースチン) から購入しました。

サンプル前処理

1 mL の血清サンプルを 6 mL のリン酸緩衝液 (0.1M、pH 6) で希釈しました。次に、50 µL の内部標準物質の混合溶液を添加しました (D_{11}-アンフェタミン、D_{11}-メタアンフェタミン、D_5-MDA、D_5-MDMA、D_6-MDE、および D_9-THC-COOH のメタノール溶液をそれぞれ 1 ng/µL、D_3-THC と D_3-THC-OH をそれぞれ 0.1 ng/µL) 。サンプルは 3 分間混合し、混合物を 3,000rpm で 10 分間遠心分離しました。固相抽出は、Caliper Rapid-Trace SPE ワークステーションを使用して自動で、または真空マニフォールドを使用して手動で行いました。

上澄み液を、2×3mL のメタノールと 2mL の水でフラッシュ洗浄することによりコンディショニングした固相抽出カラム (Bakerbond SPE C18、500 mg) にアプライしました。カラムは 2×2 mL の水、2×2 mL の水/メタノール (80:20、v/v) 、および 1 mL の 0.1M 酢酸で洗浄しました。カラムは 10 分間乾燥させました。

溶出は、2 ステップで実行しました。まず、カンナビノイドを 3 mL のジクロロメタン/アセトン (50:50、v/v)で溶出してから、アンフェタミン、アヘン、およびコカイン/代謝物を 3 mL のジクロロメタン/2 -プロパノール/アンモニア (40:10:2、v/v/v)で溶出しました。両方の抽出物を、30℃の少量の窒素ストリームのもとで乾固させ、0.1 mL のメタノールで再溶解し、両方を混合しました。この混合した SPE フラクションは、クロマトグラフィピーク形状を改善するために水で希釈しました。(1:4 の比率)。

LC/MS/MS メソッド

LC/MS/MS は、Agilent 1200 Rapid Resolution 液体クロマトグラフと Agilent G6410A トリプル四重極質量分析計から構成されます。良好なクロマトグラフィ分離能を維持しつつ、分析速度を最適化するために、溶媒、流量、およびカラムパラメータを組み合わせて、さまざまな ZORBAX カラムを評価しました。

最適な結果は、水/アセトニトリルグラジエント (どちらも 0.1 %のギ酸を含む) を使用した 1.8 µm の粒子径の ZORBAX SB-C18 カラム (2.1×100 mm) で得られました。詳細な LC 条件を表 1 に示します。

表1. LCメソッド

カラム	ZORBAX RRHT SB-C18 (内径 2.1mm×100mm、1.8µm) p/n 828700-902
カラム温度	70 °C
移動相	A: 水中の 0.1 % ギ酸 B: アセトニトリル中の 0.1 % ギ酸
流量	0.6mL/分
グラジェント	0 分で 10% B 2 分で 10% B 8 分で 95% B 11 分で 95% B 11.5 分で 10% B
停止時間	15 分
ポスト時間	なし
注入量	10 µL (ピーク形状を改善するために、1:4 の比率で水で希釈したサンプル 1:4 でピーク形状を改善)

標準 ESI および APCI ソースに加えて、Agilent G1978B マルチモードソースを質量分析計と組み合わせました。MMI ソースは、同時イオン化モードで (ESI と APCI を正極性で同時に) 操作するか、クロマトグラフィの保持時間に基づいて単独の ESI モードと単独の APCI モードのイオン化法を切り替えて操作しました。最適化されたソースパラメータを表 2 に示します。

検体と内部標準の両方についての最適な MRM トランジションの決定は、約 1 µg/mL の濃度レベルでの単一成分のフローインジェクションアナリシスによって行いました。表 3 を参照してください

結果と考察

可能な 4 つの MMI モードを検討しました (図 3)。ESI モードから開始し、5 分後に APCI モードに切り替わる MMI ソッドを使用した結果、全体として最適な化合物レスポンスが得られました。イオン化モードを切り替えた後でベーパライザ温度が 175 ℃から 250 ℃ に変化し、その変化のためにカンナビノイド溶出の前に少々時間が必要なため、LC メソッドの分析速度は完全には最適化しませんでした (表 1) 。開始グラジエント条件でのカラムの再平衡時間を含む合計分析時間は 15 分でした。

表2. 最適化されたMMIパラメータ

MMIモード	ネブライザガス圧 (psi)	乾燥ガス流量 (L/分)	乾燥ガス温度 (°C)	チャージング電圧 (V)	キャピラリ電圧 (V)	ベーパライザ温度 (°C)	コロナ電流 (µA)
同時イオン化	40	5	300	2000	2000	200	2
ESI単独	60	5	300	2000	2000	175	0
APCI単独	20	5	300	2000	2000	250	4

表3. MRMトランジションのデータ取り込みパラメータ

化合物	RT (分)	プリカーサ $(M-H)^+$	フラグメンタ電圧 (V)	CE (V)	プロダクトイオン (*m/z*)	CE (V)	プロダクトイオン 2 (*m/z*)
アンフェタミン	1.3	136	100	15	91	10	119
D_{11}-アンフェタミン	1.3	147	100	15	127	15	97
MDA	1.4	180	100	15	105	15	135
D_5-MDA	1.4	185	100	10	168	15	138
メチルアンフェタミン	1.5	150	100	15	91	10	119
D_{11}-メチルアンフェタミン	1.5	161	100	15	127	15	97
MDMA	1.9	194	100	10	163	15	135
D_5-MDMA	1.9	199	100	15	165	10	135
MDE	2.6	208	100	15	135	15	147
D_6-MDE	2.6	214	100	15	166	15	136
THC-OH	7.9	331	110	30	193	30	201
D_3-THC-OH	7.9	334	110	20	316	25	196
THC-COOH	8.1	345	110	30	193	30	299
D_9-THC-COOH	8.1	354	120	22	308	25	196
THC	8.6	315	110	30	193	30	259
D_3-THC	8.6	318	100	30	196	30	105

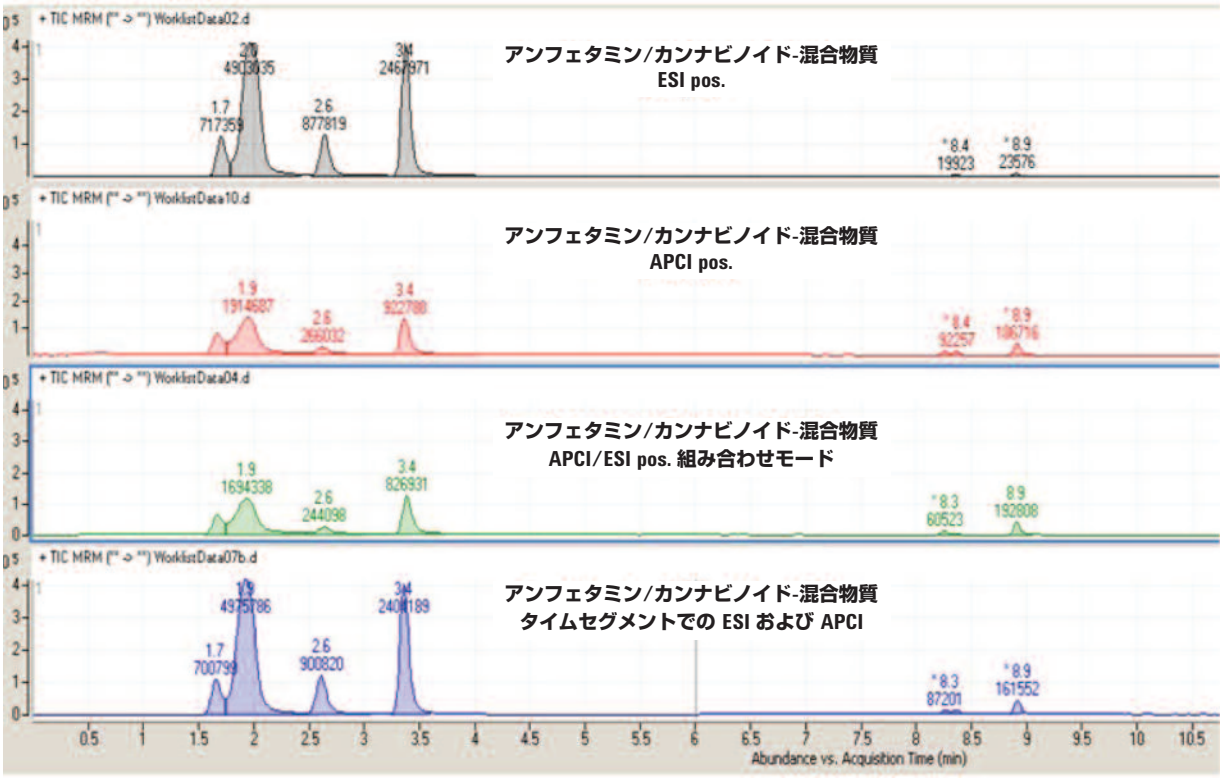

図3.　さまざまな MMI モードの比較

メソッドバリデーション

血清中の THC、THC-OH、THC-COOH、アンフェタミン、メタアンフェタミン、MDA、MDMA、および MDEの検出および定量のために、LC/MS/MS メソッドのバリデーションを行いました。メソッドのバリデーションは、Peters et al [1] および German Society of Toxicology and Forensic Chemistry (GTFCh) に従って実行しました。メソッドバリデーションは、Microsoft Excel ベースのバリデーションプログラム (VALISTAT [2]) を使用して実行しました。薬物を含まない血清をバリデーション測定用のブランクマトリクスとして使用しました。

7 つのキャリブレーション用の標準溶液を準備しました。適切な量の検体を含む 50 µL のメタノール溶液でブランク血清をスパイクすることで、さまざまなキャリブレーションレベルを得ました。キャリブレーションレベルを表 4 に示します。

表4.　血清サンプル中のアンフェタミンおよびカンナビノイドのキャリブレーション範囲

化合物	Cal 1	Cal 2	Cal 3	Cal 4	Cal 5	Cal 6	Cal 7	Cal 8
アンフェタミン	0	10	20	40	60	80	100	500
メタアンフェタミン	0	10	20	40	60	80	100	500
MDA	0	10	20	40	60	80	100	500
MDMA	0	10	20	40	60	80	100	500
MDE	0	10	20	40	60	80	100	500
THC	0	0.5	1	2	3	4	5	25
THC-OH	0	0.5	1	2	3	4	5	25
THC-COOH	0	5	10	20	30	40	50	250

6 回繰り返し注入したキャリブレーション用の標準溶液を測定することで、各化合物について 7 ポイントの検量線が得られました。キャリブレーションはテストした範囲では直線であり、決定係数はすべての化合物について 0.98 を超えました。定量のリミットを表すキャリブレーション用標準溶液の S/N 計算 Cal 3 は、ピーク間ノイズ定義に基づき、スムージングは適用しませんでした。クロマトグラフィピーク形状を改善するためにメタノール再溶解 SPE フラクションと水 (1:4 の比率) で希釈した場合でも、アンフェタミンとカンナビノイドのすべてのクオンティファイアイオンおよびクォリファイアイオンは容易に検出できました (図 4)。

アッセイ内およびアッセイ間精度データは、異なる 8 日間に2 つの濃度レベル (低、高) で実行した 2 回の分析から取得しました。アッセイ内精度 (1 日での繰り返し再現性) は、1日に実行した 2 回の測定からの 8 つの変動係数 (CV) の平均値として定義されます。アッセイ間精度 (異なる日の繰り返し再現性) は、1 日に実行した 2 回の測定の 8 つの平均値の平均からの変動係数です。アッセイ内変動係数は、2.9～15.3% の範囲でした(表 5)。異なる日の変動係数は、3.4～15.3% の範囲でした。

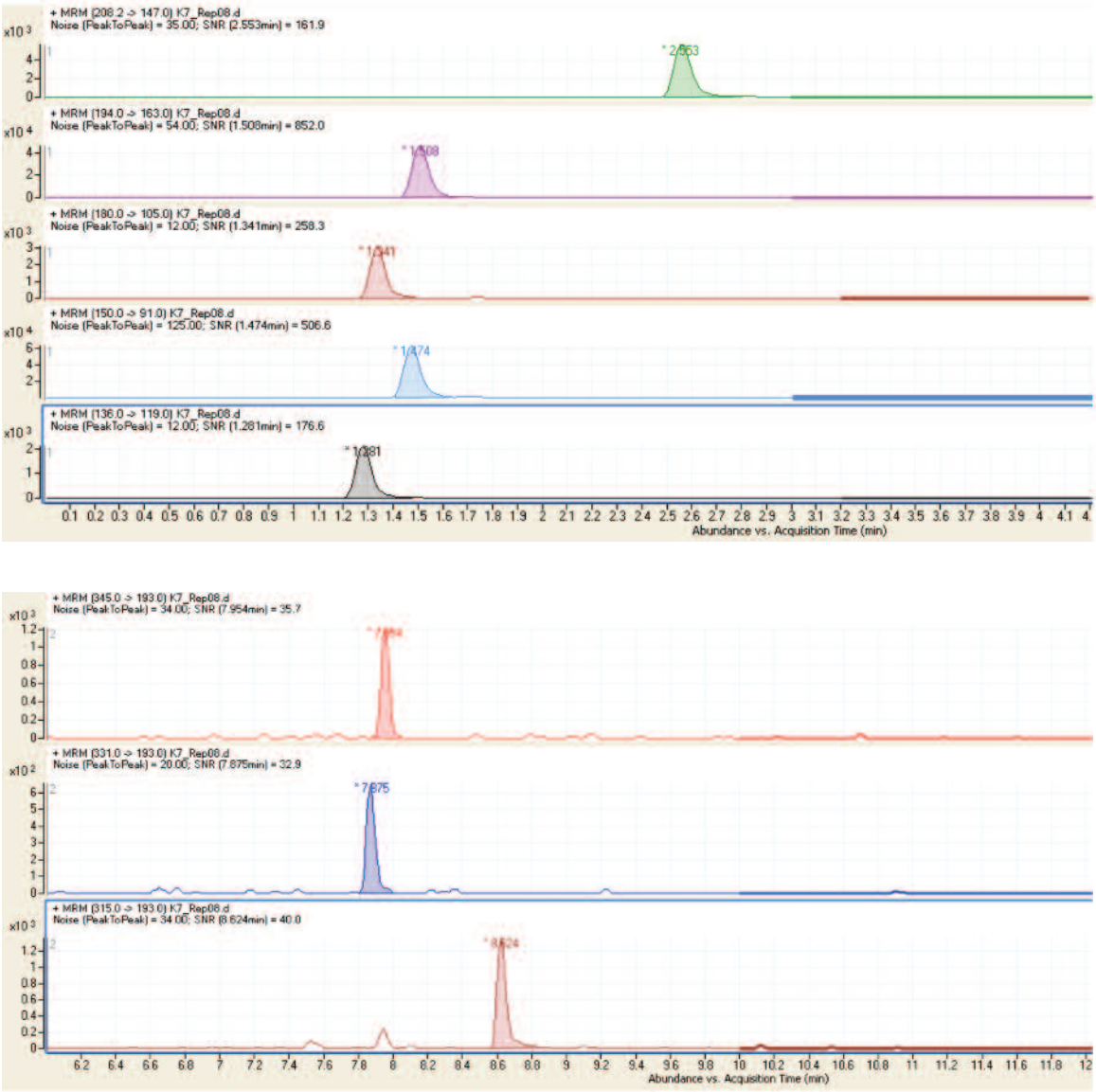

図4.　標準溶液の S/N 計算 Cal 3

表5.　2 つの濃度レベル (Cal 3 および Cal 7) でのアッセイ間およびアッセイ内精度

	アッセイ内精度 (%)		アッセイ間精度 (%)	
化合物	**CalStandard 3**	**CalStandard 7**	**CalStandard 3**	**CalStandard 7**
アンフェタミン	4.3	2.9	4.9	5.6
メタアンフェタミン	4.7	4.7	6.1	5.5
MDA	7.6	4.2	8.4	4.6
MDMA	5.9	3.2	5.9	3.4
MDE	8.5	5.2	8.5	5.6
THC	9.5	5.8	10.0	6.3
THC-OH	8.4	8.7	11.6	8.7
THC-COOH	15.3	5.4	15.3	5.5

結論

LC 分離に 1.8 µm の粒子径の RRHT カラムを使用することで、GC/MS (サイクル時間 45 分) よりも高速な分析 (サイクル時間 12 分) が提供されます。2 つの化合物クラスの極性の差異により、マルチモードイオン源を使用すると、各化合物に最適なレスポンスで 8 つの化合物を検出できます (タイムベーススケールでイオン化モードを切り替えると、最適な結果が得られます) 。確立された GC/MS メソッドと比較すると、RRLC/QQQ メソッドは、より高い感度と選択性を示しました (4 の希釈率で、GC/MS では 1 µL、LC/MS/MS では 10 µL の注入量を考慮) 。提示されたメソッドでは、1日および異なる日について良好な再現性が示されました。変化の係数は 3～15%の範囲でした。ほとんどの係数が 5～10%の範囲に収まりました。

将来的には、他の乱用薬物 (モルフィン、6-アセチルモルフィン、コデインなどのアヘン剤、およびコカインとその代謝物) がこの RRLC/QQQ メソッドに含められます。また、オンライン SPE の使用も評価されます。

参考文献

1. F. T. Peters and H. H. Maurer, “Bioanalytical Method Validation and Its Implications for Forensic and Clinical Toxicology – A review,” *Accred. Qual. Assur.* 7, 441–449 (2002)
2. G. Schmitt, M. Herbold, and F. Peters, “ Methodenvalidierung Im Forensisch-Toxikologischen Labor,” Arvecon Walldorf (2003)

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2009

Printed in Japan
May 14, 2009
5989-8368JAJP

Agilent Technologies